

Smithsonian Tropical Research Institute

Minera Panamá

PROYECTO MINA DE COBRE PANAMÁ

ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL (EsIA)

CATEGORIA III

INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO DE CONSERVACIÓN EX SITU DE ESPECIES DE INTÉRES DE ANFIBIOS

Compromisos de EsIA Aplicables	**Periodo reportado**	**Elaborado por**	**Fecha de Emisión del Reporte**
13202, 13207 13208, 13212 13221, 13223 13232, 13233	**Febrero-Abril**	**INSTITUTO SMITSONIAN DE INVESTIGACIONES TROPICALES**	**06/05/2016**

INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO

“PROPUESTA PARA LA EXTENSIÓN DE LA CONSERVACIÓN EX-SITU DE RANAS DEL ÁREA DE DONOSO POR DOS AÑOS”

Período: Febrero-Abril 2016

Por: Roberto Ibáñez D., Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá, Smithsonian Tropical Research Institute (STRI)

Fecha: 6 de mayo de 2016

Introducción

El 1 de junio de 2015, Minera Panamá S.A. (MPSA) y el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) firmaron un acuerdo con el fin de extender el proyecto de conservación ex situ de anuros del área de Donoso por 2 años. Con este acuerdo se realizarán esfuerzos de conservación e investigación que contribuirán al manejo y preservación de los anfibios de Donoso, enfocándose en las especies de interés (EdI). Este proyecto es coordinado por el Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá (PARC) y es llevado a cabo en dos instalaciones para la conservación de este amenazado grupo de vertebrados: (1) el Centro de Conservación de Anfibios de El Valle (EVACC), y (2) el Centro de Investigación y Conservación de Anfibios de Gamboa (Gamboa-ARCC). En este informe se presentan los avances, según los objetivos acordados de este proyecto, realizados durante el período Febrero-Abril de 2016.

Objetivo 1. – Mejorar los procedimientos y tácticas para el manejo de los anfibios, desarrollando mejores prácticas para la conservación ex situ de anfibios en riesgo.

Le hemos dado seguimiento a los resultados del taller *“Conservación de Anfibios de Panamá: Evaluación de Especies Amenazadas para Programas Ex situ y la Lista Roja de la UICN*”, que realizamos el 23 de octubre de 2015; en el cual, evaluamos 40 especies para la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Por petición de Louise Hobin, oficial de programa de la autoridad de la lista roja de anfibios de la UICN SSC, hemos revisado mapas e información de varias de las especies evaluadas, con el propósito de realizar las modificaciones pertinentes a la información disponible en línea sobre estas especies (http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians).

Objetivo 2. – Llevar a cabo expediciones para recolectar especies de anfibios en riesgo en el área de Donoso.

Durante este período, se llevaron a cabo tres expediciones con la intención de buscar y colectar individuos principalmente de tres Especies de Interés (EdI): *Atelopus varius*, *Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta*, dentro del área de desarrollo del Proyecto Mina de Cobre Panamá, distrito de Donoso, provincia de Colón. Estas expediciones se realizaron en las fechas siguientes: (1) 13-19 de febrero, (2) 13-22 de marzo y (3) 17-26 de abril de 2016. En

estas expediciones, Jorge Guerrel, Rigoberto Díaz y Edgardo Griffith recolectaron individuos fundadores para el programa de conservación ex situ.



***Oophaga vicentei* del área de Donoso, en Gamboa-ARCC.**

En la expedición de febrero, se recolectaron 2 parejas en amplexo de *A. varius* (i.e., 2 machos y 2 hembras adultos) en la Quebrada Valle Grande, las cuales fueron depositadas en el EVACC. En la expedición de marzo, se colectaron 10 machos adultos de *A. varius* y 1 hembra adulta de *Oophaga vicentei* en la quebrada de Nuevo Petaquilla (Primera Corriente), que se depositaron en el Gamboa-ARCC. En la expedición de abril, se obtuvieron 9 machos adultos y 2 hembras juveniles de *A. varius* y 5 hembras adultas de *O. vicentei* en la quebrada de Nuevo Petaquilla (Primera Corriente), los cuales fueron depositados en el Gamboa-ARCC. Desafortunadamente, por medio del análisis de qPCR, se detectó el hongo patógeno de los anfibios, *Batrachochytrium dendrobatidis*, en los individuos de *A. varius* recolectados durante las tres expediciones que se realizaron en este período, como se indica en el cuadro siguiente:

Especie	Número de individuos según el mes de la expedición						Total	
	Febrero		Marzo		Abril			
	Colectados	Infectados	Colectados	Infectados	Colectados	Infectados	Colectados	Infectados
Atelopus varius	4	3	10	8	11	1	25	**12**
Oophaga vicentei	0	0	1	0	5	0	6	**0**
Total	**4**	**3**	**11**	**8**	**16**	**1**	**16**	**1**

Los individuos de *A. varius* de las poblaciones del área de Donoso, aparentemente no responden bien al tratamiento preventivo con Itraconazol; por lo que, los individuos se han mantenido bajo observación y hemos iniciado algunos ensayos con otros tratamientos y medicamentos alternos. Les estamos dándole seguimiento a cada uno de los individuos que se encuentran en los salones de cuarentena, a través de hisopados de la piel y pruebas de qPCR para detectar la presencia y el grado de abundancia del *B. dendrobatidis*. No obstante, la supervivencia de estos individuos ha sido baja. De los 25 individuos de *A. varius* colectados durante este período, solamente 14 individuos aún viven. Adicionalmente, hemos observado la aparición del hongo *Fusarium* cf. *solani* en la piel de algunas de estas ranas enfermas y recién muertas.

Objetivo 3. – Completar y mantener instalaciones para la cría y reproducción de poblaciones en cautividad de las especies de anfibios de interés de Donoso (fondos para dos años adicionales).

Con el propósito de mejorar la cría y reproducción de anfibios en cautiverio, hemos invertido en la capacitación de personal. En este período, contamos con dos pasantes locales, Vielka Ramírez y Yarineth Valdés, quienes residen en El Valle de Antón y esperamos alguna de ellas que pase a ser empleada del proyecto en un futuro cercano. Adicionalmente, cuatro empleados de ambas instalaciones del proyecto PARC: Milagro González, Nancy Fairchild, Rigoberto Díaz y Yeisson Muñoz, asistieron al curso *"Biología, Manejo y Conservación de Salamandras Neotropicales"*, que se llevó a cabo durante el 14 al 18 de marzo de 2016, en el

Centro Costarricense de Investigación de Anfibios en Siquirres, Costa Rica. Este curso fue organizado por Amphibian Ark, que además cubrió los costos del curso, alojamiento, alimentación y trasporte terrestre de nuestros empleados. Durante este curso, los asistentes fueron capacitados en el manejo en cautiverio de salamandras, aplicable a otros grupos de anfibios.

Realizamos un taller de planificación estratégica de nuestro proyecto, durante 5-7 de abril de 2016, en el Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, Virginia, USA, donde participaron los directores, encargados de las instalaciones, veterinarios y colaboradores del proyecto. Durante este taller, evaluamos y revisamos los planes relacionados al aumento de capacidad, el manejo de las poblaciones de anfibios en cautividad y las necesidades de investigación y educación del proyecto PARC, con miras a mejorar la ejecución y el desarrollo de este proyecto en los próximos 5 años.

A finales de abril, un grupo de ingenieros y personal del Instituto Smithsonian realizó una inspección de las estructuras y los sistemas eléctrico, agua potable, alarmas contra incendio y séptico del EVACC, con el propósito de determinar cuáles son las reparaciones prioritarias que se requieren para salvaguardar la integridad física del personal y de los animales que se mantienen en esta instalación. Adicionalmente, hemos realizado algunas reparaciones menores y mantenimiento de los aires acondicionados de los contenedores y del generador eléctrico del Centro de Investigación y Conservación de Anfibios de Gamboa (Gamboa-ARCC).

La producción de invertebrados se ha mantenido al nivel requerido, tanto en EVACC como Gamboa-ARCC, donde se producen principalmente grillos, dos especies de moscas de la frutas, colémbolos y cucarachas para alimentar a las poblaciones de anfibios en cautiverio.

Los números de individuos de las poblaciones en cautiverio de las especies de anuros, procedentes del área de Donoso, que mantenemos actualmente en nuestras instalaciones son:

Especie	Machos	Hembras	Juveniles	Ranas totales	Reproducción en cautiverio	Renacuajos	Instalación
Andinobates geminisae	15	18	1	34	+	10	Gamboa-ARCC
Andinobates cf. *minutus*	1	1	0	2	-	0	EVACC
Atelopus varius	44	19	370	433	+	>400	EVACC y Gamboa-ARCC
Craugastor evanesco	20	19	4	43	+		EVACC
Ecnomiohyla miliaria	2	0	0	2	-	0	EVACC
E. veraguensis	2	0	0	2	-	0	EVACC
Incilius coniferus	1	1	1	3	-	0	EVACC (exhibición)
Gastrotheca cornuta	1	0	0	1	-		EVACC
Oophaga vicentei	24	29	5	58	+	~25	Gamboa-ARCC y EVACC
Total	**110**	**87**	**381**	**578**		**>435**	Gamboa-ARCC y EVACC

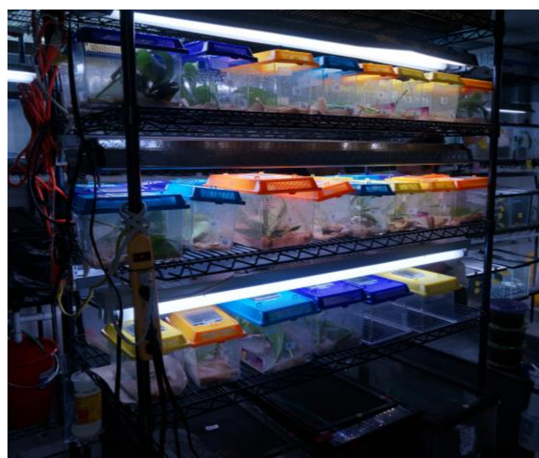
Nota: *Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta* no presentan etapa de renacuajo libre.

Al 30 de abril de 2016, manteníamos 578 ranas de 9 especies de anuros del área de Donoso. Entre las especies que se mantienen en cautiverio están las cuatro Especies de Interés (EdI) del Proyecto Mina de Cobre Panamá: *Andinobates geminisae*, *Atelopus varius*, *Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta*. Adicionalmente, el proyecto PARC mantiene especies endémicas de distribución restringida: *Ecnomiohyla veraguensis* y *Oophaga vicentei*, que se encuentran en el área de Donoso y las cuales pueden ser consideradas como especies en peligro y vulnerable, respectivamente. Otras especies, también, provenientes del área de

desarrollo del Proyecto Mina de Cobre Panamá, como *Ecnomiohyla miliaria* e *Incilius coniferus*, se tienen con el propósito de estudiarlas por ser especies raras o para exhibición. Además, dos ejemplares de una especie parecida a *Andinobates minutus*.

Prácticamente tenemos suficientes individuos fundadores para tres de estas especies: *Andinobates geminisae*, *Craugastor evanesco* y *Oophaga vicentei,* aunque sería recomendable obtener 1-2 hembras de *C. evanesco* y 7-9 individuos de *A. geminisae* más. Aún requerimos recolectar 6-8 hembras de *Atelopus varius*, ya que hemos colectado individuos de dos poblaciones distantes y sería conveniente tener más hembras de una de estas poblaciones. En el caso de *Gastrotheca cornuta*, a pesar de los esfuerzos de colecta realizados en el área, no ha sido posible encontrar más de un individuo, pero continuamos buscándolos.

Durante el período Febrero-Abril, hubo varios eventos de reproducción de las especies *Andinobates geminisae* y *Oophaga vicentei*, los cuales aún constituyen el inicio para establecer poblaciones estables en cautiverio del programa de conservación ex situ. Hemos observado el "Spindly Leg Syndrome" (SLS) en post-metamorfos de ambas especies, el cual impide el movimiento para una adecuada alimentación y conlleva a la muerte del individuo. La causa de este síndrome aún no ha sido dilucidada. Al final del período, estimamos que se tenían unos 35 renacuajos de las dos especies, ya que no se pueden contar todos los renacuajos por encontrarse entre las axilas de las hojas de las plantas bromelias. Hubo una puesta fértil de *Atelopus varius* con más de 300 renacuajos, que aunado a los renacuajos y juveniles de puestas anteriores, constituye un gran avance hacia lo conformación de poblaciones estables en cautiverio de esta especie. La reproducción de parejas de *Craugastor evanesco* no fue exitosa, ya que aparentemente pusieron muy pocos huevos e infértiles.



Tanques con juveniles de *Atelopus varius*, resultado de la reproducción exitosa de esta especie, en EVACC.

A finales de este período, la Dra. Gina Della Togna aplicó técnicas de reproducción asistida para obtener orina con esperma de 4 machos de *A. varius*, provenientes del área de Donoso. Sus espermatozoides fueron criopreservados para el manejo de la genética de las poblaciones en cautiverio; ya que, en caso de que estos animales fundadores fallezcan sin reproducirse, aún tendremos sus gametos para fertilizar células huevo de hembras en el futuro.

Objetivo 4. - Estudio de los agentes patógenos de anfibios, hongos* Batrachochytrium dendrobatidis *y* Fusarium *cf.* solani*, en la región de Donoso.

En el transcurso del trabajo que hemos estado realizando en el área de Donoso, observamos una alta mortalidad en los individuos de *Atelopus varius* recolectados. El problema en estos individuos empieza con la aparición de pequeñas lesiones en la piel, la cuales se van agrandando en tamaño y, luego, aparece una especie de moho en su piel, que termina con la muerte del individuo. Las lesiones iniciales se han detectado en individuos recién llegados a nuestras instalaciones, pero se agravan durante el período de cuarentena. Exámenes de

necropsia muestran que las ranas presentaban una fuerte dermatitis, aparentemente causada por una especie de hongo, *Fusarium* cf. *solani*, distinto al hongo quitridio *B. dendrobatidis*. No obstante, lógicamente, es necesario: (1) determinar la especie del hongo *Fusarium* de manera precisa, (2) probar que este hongo es el patógeno que causa la enfermedad y muerte en las ranas, y (3) diagnosticar la enfermedad a tiempo y tratar las ranas infectadas. Consecuentemente, requerimos realizar estudios de sistemática molecular sobre el hongo *Fusarium*, exámenes patológicos de las ranas, experimentos para establecer si es el agente causante de la enfermedad, o si se trata de un oportunista, y realizar ensayos que permitan detectar el patógeno y curar a las ranas afectadas.

Desde el 9 de diciembre de 2015 hasta el 3 de marzo de 2016, realizamos los primeros ensayos con sapitos túngara, *Engystomops pustulosus*, para establecer si el hongo *Fusarium* cf. *solani* cumple con los postulados de Koch y realmente es el agente causante de infección y muerte en anuros. Utilizamos a esta especie, ya que es una especie común y no es una especie amenazada como *Atelopus varius*. Además, deseábamos determinar si el tratamiento con Itraconazol hace a las ranas más susceptibles a enfermarse y fallecer por causa de este hongo potencialmente oportunista. Consecuentemente, llevamos a cabo dos experimentos, con la colaboración de la MSc. Nivia Ríos de la Universidad de Panamá. En el primer experimento controlado, expusimos al grupo tratamiento a cultivos de *Fusarium*. Al término de este experimento, no hubo diferencias en la supervivencia de los individuos entre los grupos tratamiento y control. Sin embargo, se aisló el hongo *Fusarium* del individuo del grupo tratamiento que falleció durante el experimento. Seguidamente, utilizando los mismos individuos del experimento anterior, realizamos un segundo experimento, donde tratamos a todos los individuos con un baño de Itraconazol (0.01 mg/mL) por 10 días. En este segundo experimento, observamos una menor supervivencia de los individuos, especialmente en el grupo control; lo cual, sugiere que el baño de Itraconazol pudiese tener un efecto negativo, pero que requiere ser comprobado por medio de experimentos adicionales. No obstante, el hongo *Fusarium* no fue aislado de los individuos que sobrevivieron hasta el final del experimento; por lo que, probablemente, la mayoría de los individuos no fueron infectados durante la exposición a este hongo. Es posible que los individuos de la especie *E. pustulosus* sean más resistentes que *A. varius* a la infección por este hongo; por lo tanto, consideramos necesario utilizar a esta última especie en experimentos subsecuentes.



Imagen del *Fusarium* aislado y microcultivado durante el experimento.

En cuanto a los cultivos de dos cepas de *Fusarium* cf. *solani*, originalmente aisladas de individuos de ranas de *Atelopus varius* del área de Donoso, que fueron enviados al Dr. Douglas Woodhams de la University of Massachusetts Boston. El Dr. Woodhams y su equipo de trabajo continuaron realizando ensayos de inhibición con una de estas cepas, utilizando antibióticos y antimicóticos.

El Dr. Kerry O'Donnell del National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (NCAUR-ARS-USDA), quien recibió las cuatro cepas de *Fusarium* cf. *solani* que fueron originalmente aisladas de individuos de ranas de *Atelopus varius* del área de Donoso, nos informó sobre sus resultados preliminares.

El Dr. O'Donnell, que es un especialista en este género de hongos, nos indicó que secuenció el ADN de tres de estas cepas y encontró dos haplotipos de una especie de *Fusarium* distinta a *F. solani*.

En relación a la prevalencia del hongo *B. dendrobatidis* en los anfibios que fueron encontrados en el área de Donoso, durante las expediciones realizadas en los meses de febrero, marzo y abril de 2016, se obtuvieron muestras de la piel con hisopos de 24, 50 y 73 anfibios, respectivamente. Los sitios donde se obtuvieron las muestras fueron: Quebrada Valle Grande, cabecera del Río Petaquilla, la quebrada de Nuevo Petaquilla (Primera Corriente) y en el área de la Presa de relaves en el área llamada Coffer Dam. Los anfibios que fueron muestreados incluyen individuos de las especies EdI colectadas e individuos de éstas y otras especies que fueron liberadas inmediatamente después de tomarles la muestra. Por el momento, solamente se han analizado muestras de los anuros que fueron depositadas en el EVACC y Gamboa-ARCC, varias de las cuales resultaron *B. dendrobatidis* positivas, como se indicó previamente (ver sección del Objetivo 2). El resto de las muestras serán procesadas próximamente.